

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 3 6 号	学位授与年月日	平成 1 9 年 2 月 1 4 日
氏 名	村 松 英 彰		
論文題目	<p>Effect of basic amino acids on susceptibility to carbapenems in clinical <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates  (緑膿菌臨床分離株におけるカルバペネム系薬に対する感受性への塩基性アミノ酸の影響)</p>		

博士(医学) 村 松 英 彰

## 論文題目

Effect of basic amino acids on susceptibility to carbapenems in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates

(緑膿菌臨床分離株におけるカルバペネム系薬に対する感受性への塩基性アミノ酸の影響)

## 論文の内容の要旨

### 〔はじめに〕

多剤耐性緑膿菌による感染症の治療は難しく、臨床の現場で問題となっている。様々な耐性機序が解明されており、抗菌薬の排出ポンプや低い外膜透過性、さらにはそれらの相乗作用によるものなどがある。*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) において、外膜上の透過孔蛋白質であるOprDの欠損は主にイミペネムの耐性に関与しているが、メロペネムに対しては低度の耐性に関与しているだけである。OprDは塩基性アミノ酸の結合部位を持ち、塩基性アミノ酸を促進拡散により取り込む。イミペネムはOprDを通して外膜を透過し、その透過は塩基性アミノ酸によって競合的に阻害される。イミペネムとパニペネムはアミノ酸濃度が低い培地において強い抗緑膿菌活性を示す。カルバペネム系薬はヒトの血漿のような生体液中においてMueller-Hinton brothより強い抗緑膿菌活性を示すが、生体液にリジンを添加すると抗緑膿菌活性は低下する。しかし、*P. aeruginosa* におけるカルバペネム系薬の感受性試験に対する培地成分の影響についての情報は限られている。今回、*P. aeruginosa* 臨床分離株におけるイミペネム、パニペネムおよびメロペネムのカルバペネム系薬3剤の感受性に対する塩基性アミノ酸、pHおよびその他の物質の影響について解析した。

### 〔材料ならびに方法〕

使用菌株は*P. aeruginosa* PAO-1 および *P. aeruginosa* 臨床分離株175株を使用した。*P. aeruginosa* PAO-1は標準菌株として用いた。使用抗菌薬はイミペネム、パニペネム、メロペネム、セフトラジウム、アズトレオナムを用いた。感受性試験では、最小発育阻止濃度 (MIC) をClinical and Laboratory Standardsによって規定された寒天平板希釈法によって測定した。感受性試験はMueller-Hinton agar (MHA)、1:16 MHAおよび1:40 MHAを用いて実施した。*P. aeruginosa* の外膜蛋白質をsodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresisを用い分析した。

### 〔結果〕

カルバペネム系薬のMIC値に対する培地成分の影響について、MHA、1:16および1:40 MHAで測定し解析した。1:16あるいは1:40 MHAでのカルバペネム系薬のMIC値は、概してMHAで測定されたMIC値と比較して低くなった。一方、セフトラジウムおよびアズトレオナムにおけるMIC値の違いは、 $\pm 2 \log_2$ の希釈の範囲内であった。カルバペネム系薬のうちパニペネムのMIC値が培地成分の影響を最も強く受けた。1株のみがMHA、1:16および1:40 MHAの間での違いが見られなかった。すべての使用抗菌薬において1:16 MHAで測定されたMIC値と1:40 MHAで測定されたMIC値は、それぞれの菌株において有意な差は見られなかった。カルバペネム系薬のMIC値に対する塩基性アミノ酸の影響について、アルギニン、リジン、およびヒスチジンをそれぞれ単独あるいは組み合わせて添加された1:16 MHAを用い解析した。カルバペネム系薬の中でパニペネムが、塩基性アミノ酸の添加によるMIC値の上昇が最も高かった。感受性を強く低

下させる特定の塩基性アミノ酸は、それぞれのカルバペネム系薬の間で異なっていた。塩基性アミノ酸は、セフトジジムおよびアズトレオナムのMIC値に対しては僅かな影響しかなかった。カルバペネム系薬のMIC値に対するpHの影響について、pH 6.8とpH 6.5、7.5、8.0の間で比較したところ、カルバペネム系薬のMIC値に有意な違いはなかった。カルバペネム系薬のMIC値に対するその他の物質の影響について、グルタミン酸、アラニン、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、デキストラン硫酸ナトリウム5000および馬血液を用い解析したが、有意な影響は見られなかった。*P. aeruginosa*の外膜蛋白質プロファイルの解析では、塩基性アミノ酸の添加でカルバペネム系薬の感受性に影響を受けなかった1株においてOprDと同定された46-kDaの蛋白質の合成が減少していた。

#### 〔考察〕

175株中の174株において、カルバペネム系薬の*P. aeruginosa*に対するMIC値は培地成分によって影響を受けたが、セフトジジムとアズトレオナムでは影響を受けなかった。カルバペネム系薬の中でパニペネムの感受性が、塩基性アミノ酸によって最も強く低下した。感受性に最も影響を与える特定の塩基性アミノ酸は、カルバペネム系薬の間で異なっていた。これらの結果は、パニペネムに対する感受性を、MHAのみで測定されたMIC値を基に他のカルバペネム系薬に対する感受性と比較・評価するのは難しいことを示唆している。1:16 MHAへの塩基性アミノ酸の添加は、*P. aeruginosa*のカルバペネム系薬に対する感受性を低下させた。塩基性アミノ酸の添加の影響を受けなかった1株では、OprDの産生が減少していることが分かった。これらの結果は、生体液におけるカルバペネム系薬の抗緑膿菌活性増強の主な理由が、OprDにおける抗菌薬と塩基性アミノ酸の競合の減少であるという報告を支持している。このカルバペネム系薬の耐性機構の出現は特に臨床上で重要になる可能性がある。メロペネムのMIC値で培地成分の影響を受けた臨床分離株の数は他のカルバペネム系薬より少なかった。メロペネムについては、OprDとは別の未知なルートの両方を通して外膜を透過し得るという報告などもある。

#### 〔結論〕

カルバペネム系薬、特にパニペネムに対する*P. aeruginosa*の感受性は、培地への塩基性アミノ酸の添加によって影響を受けることが分かった。175株中の174株において、カルバペネム系薬に対するMIC値が培地成分によって様々な影響を受けた。1:16 MHAおよびMHAで測定されたMIC値で違いが全く見られなかった1株では、OprDの産生が低下していた。これらの結果より、個々のカルバペネム系薬、特にパニペネムの感受性は、MHAを用いて測定された他のカルバペネム系薬のMIC値を基に評価するのは難しいことが示唆された。抗菌効果をより良く予測するには、それぞれのカルバペネム系薬の感受性は薬剤ごとに評価することが重要であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

多剤耐性緑膿菌による感染症の治療は臨床の現場で大きな問題となっており、抗菌薬に対する正しい感受性試験の情報が求められている。カルバペネム系薬は、感受性試験に汎用される培地であるMueller-Hinton broth (MHB)より、ヒト血漿のような生体液中で強い抗緑膿菌活性を示す。この為、感受性試験の結果と臨床的有効性に乖離が認められる事が多い。このことは、緑膿菌の外膜に存在するOprD(ポーリン)が塩基性アミノ酸の結合部位を持ち、塩基性アミノ酸を促進的に取込むことと関連すると考えられる。

実際、カルバペネム系薬の1つであるイミペネムはOprDを介して外膜を透過し、緑膿菌に取込まれることが知られている。MHBはヒト血漿の約40倍のアミノ酸を含有しているので、イミペネムの取り込みが競合的に阻害されると考えられる。そこで、申請者らは緑膿菌臨床分離株に対するカルバペネム系薬の感受性試験における培地成分の影響を検討した。具体的には緑膿菌臨床分離株175株を用いて、イミペネム、パニペネムおよびメロペネムのカルバペネム系薬3剤の感受性試験に対する塩基性アミノ酸、pHおよびその他の物質の影響について検討した。

得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) カルバペネム系薬の最小発育阻止濃度(MIC)値をMuller-Hinton agar (MHA)とMHBの濃度を低くした寒天培地で比較したところ、1株を除いてMHB濃度の低い寒天培地(1:16 MHAおよび1:40 MHA)の方が低いMIC値を示した。しかし、対照として用いたセフトラジウムおよびアズトレオナムにおいては両培地で有意な差は認めなかった。
- (2) 塩基性アミノ酸の影響を検討するため、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを各々単独あるいは混合して1:16 MHAに加えたところ、パニペネムが最も影響を受け、MIC値が上昇した。セフトラジウムおよびアズトレオナムは塩基性アミノ酸の影響を受けなかった。
- (3) カルバペネム系薬のMIC値に対するpHの影響は、pH6.5、pH6.8、pH7.5、pH8.0の間で差を認めなかった。
- (4) カルバペネム系薬のMIC値に対して、グルタミン酸、アラニン、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、デキストラン硫酸ナトリウム500および馬血清は影響を与えなかった。
- (5) 塩基性アミノ酸の添加でカルバペネム系薬の感受性に影響を受けなかった緑膿菌の1株ではOprDの合成が著明に低下していた。

以上より、カルバペネム系薬、特にパニペネムに対する緑膿菌の感受性をMHAで測定することは問題があり、アミノ酸濃度の低い培地を用いる必要があることを示唆した。

審査委員会では、多数の緑膿菌臨床分離株を用い、カルバペネム系薬のMIC値に与える各塩基性アミノ酸の影響を詳細に検討した点、および、MHAを用いて緑膿菌に対する各カルバペネム系薬のMIC値を一律に評価することは妥当でないことを証明した点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) 1:16 MHA及び1:40 MHAは何を意味するのか
- 2) MHAにおける緑膿菌の増殖と薬剤の抗菌作用の関係について
- 3) カルバペネム系薬の中で、パニペネムが最も塩基性アミノ酸の添加による影響を受ける理由について
- 4) 感受性に最も影響を与える塩基性アミノ酸が、カルバペネム系薬の間で異なる理由について
- 5) 対照として用いたセフトラジウム及びアズトレオナムはどのような機序で緑膿菌に取込まれるか
- 6) 塩基性アミノ酸添加の影響を検討した24臨床分離株を175株から選択した基準は
- 7) 各塩基性アミノ酸により抗菌活性に与える影響が異なるのは何故か
- 8) pHの抗菌活性に与える影響を検討した理由は
- 9) メロペネムを取込むOprD以外のルートについて
- 10) OprD産生減少株は論文で示された1株以外にも存在したか
- 11) 結論的にどの培地を使えばカルバペネム系薬のMICを公平に評価できるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	小	出	幸	夫				
	副査	梅	村	和	夫	副査	飯	嶋	重 雄